

09/623596  
526 Received PCT/PTC 05 SEP 2000

DOCKET NO.: 196841US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

- IN RE APPLICATION OF: Masaaki WACHI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP99/01084

INTERNATIONAL FILING DATE: 05 March 1999

FOR: A GENE CODING FOR PENICILLIN BINDING PROTEIN AND A METHOD FOR  
PRODUCING L-GLUTAMIC ACID

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the  
applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
JAPAN	10/55608	06 March 1998

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the  
International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP99/01084**.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

ESU

PCT/JP 99/01084

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

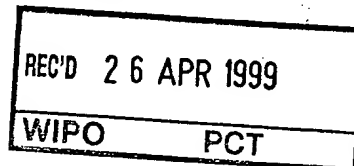
05.03.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 3月 6日



出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第055608号

出願人  
Applicant (s):

味の素株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT

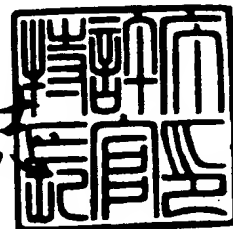
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

1999年 4月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建



出証番号 出証特平11-3021214

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-5401

【提出日】 平成10年 3月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/14

【発明の名称】 発酵法によるL-グルタミン酸の製造法

【請求項の数】 5

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市南つくし野 1-4-1-13-202

    【氏名】 和地 正明

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都豊島区池袋 3-42-17

    【氏名】 永井 和夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089244

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100090516

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

    【識別番号】 100100549

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 川口 嘉之

    【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9117157

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法による L-グルタミン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ペニシリン結合蛋白が正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中に L-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とする L-グルタミン酸の製造法。

【請求項 2】 前記コリネ型細菌が、第 1 の温度ではペニシリン結合蛋白が正常に機能し、第 2 の温度ではペニシリン結合蛋白が正常に機能しない細菌であり、

該細菌を、第 1 の温度で培養して増殖させる工程と、第 2 の温度で培養して L-グルタミン酸を産生させる工程とを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記コリネ型細菌が、ペニシリン結合蛋白をコードする遺伝子 (PBP 遺伝子) と温度感受性複製起点とを含むプラスミドを保持し、かつ染色体上の PBP 遺伝子が機能しない細菌であり、第 1 の温度では前記プラスミドが複製可能であり、第 2 の温度では前記プラスミドが複製不能である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記コリネ型細菌が産生するペニシリン結合蛋白が温度感受性変異を有する請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】 前記ペニシリン結合蛋白が、ペニシリン G を結合させたときに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約 60,000 を示す蛋白質である請求項 1~4 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵法による L-グルタミン酸の製造方法に関する。L-グルタミン酸は調味料原料等として広く用いられている。

【0002】

【従来技術】

コリネ型細菌をビオチン量を制限した培地で培養すると同細菌は著量のL-グルタミン酸を生産する。一方、コリネ型細菌をビオチンが過剰量存在する培地中で培養すると同細菌はL-グルタミン酸を生産しないが、この培養条件でも培地に界面活性剤またはペニシリン等のビオチン作用抑制物質を添加すると、同細菌の生育は抑制され、同細菌は著量のL-グルタミン酸を生成するようになることが知られている。

## 【0003】

ペニシリンを培地に添加した際のグルタミン酸生成に関する研究は古くからなされている (T. D. Nunheimer, J. Birnbaum, E. D. Ihnen and A. L. Demasin, Appl. Microbiol., 20, 215-217 (1970))。ペニシリンの効果は細胞表層の構造変化を引き起こし、グルタミン酸の細胞質膜の透過性を向上させることだと考えられてきた。

## 【0004】

一方、ビオチンの制限または界面活性剤もしくはペニシリンの添加が、どのような作用機作を通じてコリネ型細菌のL-グルタミン酸の生産性に影響するかについて研究が行われ、L-グルタミン酸生産に関与すると思われる遺伝子の存在が突き止められている (d t s R 遺伝子)。そして、この d t s R 遺伝子が破壊された株は、野生株がほとんどL-グルタミン酸を生成しない量のビオチンが存在する条件においても著量のL-グルタミン酸を生成することが確認されている (W095/23224号国際公開パンフレット)。

## 【0005】

さらに、細胞質膜の透過性の向上によりグルタミン酸生成を説明できない知見が多く得られており、ペニシリンによるグルタミン酸生成機構は未だ不明であった (木村英一郎、河原義雄、中松 亘、蛋白質核酸酵素、第42巻、第2633~2640頁(1997))。

## 【0006】

ところで、ペニシリン結合蛋白 (PBP: penicillin binding protein) が細菌の細胞分裂に重要な役割を果たすことは良く知られている。ペニシリン結合蛋白は細菌の細胞表層に存在する酵素類であると考えられており、ペニシリン等の

$\beta$ -ラクタム抗生物質と特異的に結合する。細菌の種によって異なるが、大腸菌においては、通常3～8種類検出され、分子量は40,000～120,000前後に分布すると考えられている。ペニシリンは、ペニシリン結合蛋白の活性部位のセリン残基に結合して酵素反応を阻害する。

## 【0007】

特に中心的に研究が行われたエシェリヒア・コリ (E. coli) では、7つのペニシリン結合蛋白が存在することが分かっており (B. G. Spratt, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, 2999(1975))、その中でPBP 2およびPBP 3と命名されたものが細胞分裂に重要な働きをしていることが示された (B. G. Spratt, J. Bacteriol., 131, 293 (1977))。しかしながら、コリネ型細菌にペニシリン結合蛋白が存在するかについては知られていなかった。

## 【0008】

## 【発明の概要】

本発明者は、コリネ型細菌にもペニシリン結合蛋白 (以下、「PBP」と略す) が存在するかを調べ、その機能を解析した。その結果、コリネ型細菌のペニシリンによるグルタミン酸生成機構解明への新知見を得ると同時に、コリネ型細菌のグルタミン酸生産能の向上に対し、従来知られていなかった観点からの開発に応用できることを見出した。

## 【0009】

本発明は、上記知見を基になされたものであり、PBPが正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法に関する。

## 【0010】

本発明の好ましい態様は、前記方法において、コリネ型細菌が、第1の温度ではPBPが正常に機能し、第2の温度ではPBPが正常に機能しない細菌であり、該細菌を、第1の温度で培養して増殖させる工程と、第2の温度で培養してL-グルタミン酸を産生させる工程とを含む方法である。

## 【0011】

また、本発明の他の態様は、前記方法において、コリネ型細菌が、PBPをコードする遺伝子（PBP遺伝子）と温度感受性複製起点とを含むプラスミドを保持し、かつ染色体上のPBP遺伝子が機能しない細菌であり、第1の温度では前記プラスミドが複製可能であり、第2の温度では前記プラスミドが複製不能である方法である。

## 【0012】

さらに、本発明の別の態様は、前記方法において、コリネ型細菌が産生するPBPが温度感受性変異を有する方法である。

また本発明のさらに別の態様は、前記方法において、PBPが、ペニシリンGを結合させたときにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約60,000を示す蛋白質である方法である。

## 【0013】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0014】

## &lt;1&gt;コリネ型細菌のPBP

本発明において、コリネ型細菌とは、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

## 【0015】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ブレヴィバクテリウム・ディバリカタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）



ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・インマリオフィラム

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・ロゼウム

ブレバクテリウム・サッカロリテイカム

ブレバクテリウム・チオゲニタリス

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

【0016】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965

ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020

ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067

ブレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869

ブレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレバクテリウム・サッカロリテイカム ATCC14066

ブレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERM BP-1539)

## 【0017】

本発明にいうPBPは、上記のようなコリネ型細菌の細胞表層に存在する膜蛋白質であり、ペニシリンと接触すると共有結合により結合する。PBPは、例えば、コリネ型細菌の膜面分に標識化したペニシリンを加えて反応させ、界面活性剤可溶性画分をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、標識を可視化することによって検出することができる（ペニシリン結合試験）。ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムのPBPは、後記実施例に示すように、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により、ペニシリンGが結合した状態で分子量約110kDa、100kDa、および60kDaの3つのバンドとして検出され、それぞれをPBP1、PBP2、およびPBP3と命名された。

## 【0018】

これらのPBPと、ペニシリンGの誘導体であるメシリナム（mecillinam）との親和性を調べた結果、メシリナムはPBP3と選択的に結合することが明らかとなった。また、ビオチンが十分量存在する条件下でブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムを培養したところ、メシリナムを一定濃度で存在させるとL-グルタミン酸が生成することが判明した。これらのことから、PBP、少なくともPBP3の機能を阻害することにより、十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸の生成が引き起こされることが示された。したがって、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌は、ビオチンが十分量存在していても、ビオチン作用抑制物質を添加することなくL-グルタミン酸生成を引き起こすことが可能となる。また、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌は、L-グルタミン酸生産能が向上する可能性もある。さらに、PBP遺伝子を操作することにより、コリネ型L-グルタミン酸生産に関する新たな知見が得られ、従来知られていなかった観点からの開発に応用することができる。

## 【0019】

本発明において、「PBPが正常に機能しない」とは、上記のように十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸の生成が引き起こされる状態をいい、PBP遺伝子の転写又は翻訳が妨げられPBPが産生されない状態であってもよいし、産生されるPBPに変異が起こり、PBPの機能が低下又は消失した状態であっ

てもよい。

【0020】

<2>PBPが正常に機能しないコリネ型細菌

本発明のL-グルタミン酸の製造法に用いるコリネ型細菌は、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌であり、その好ましい態様は、第1の培養条件ではPBPが正常に機能し、第2の培養条件ではPBPが正常に機能しない細菌である。このようなコリネ型細菌は、第1の培養条件では増殖することができ、第2の培養条件では十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸を産生することができる。PBPとしては、PBP3が好ましい。

前記培養条件としては、培養の温度、培地の浸透圧、pH及び培地成分等が挙げられる。培地成分としては、IPTG（イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド）、酢酸のような誘導物質、グルコースのような抑制物質が挙げられる。以下の記載において、培養条件として培養温度を例に説明するが、他の培養条件の場合には、以下の説明中の「温度」をその条件に置き換えればよい。

【0021】

PBPが正常に機能しないコリネ型細菌としては、例えば、正常に機能するPBPが発現しないようにPBPをコードする遺伝子（PBP遺伝子）に変異が生じた変異株が挙げられる。前記変異は、PBP遺伝子の転写又は翻訳を妨げる変異であってもよいし、正常に機能しないPBPを産生するような変異であってもよい。

【0022】

PBPを完全に欠損する変異は致死的となるため、前記変異株は、温度感受性変異等の条件変異株として取得され得る。このような変異株は、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射または化学薬剤による処理を行い、第1の温度（例えば低温）では増殖することができ、第2の温度（例えば高温）では増殖しない温度感受性変異株を取得し、得られた変異株の中から、第1の温度で増殖でき、かつ、第2の温度で培養したときに十分量のビオチン存在下でL-グルタミン酸を生成する変異株を選択することによって得られる。尚、このような性質を示す変異株としては、DTSR蛋白欠損株（WO95/23224号国際公開パンフレット）

及び $\alpha$ -KGDH欠損株(WO95/34672号国際公開パンフレット)も選択され得るが、候補株がPBPに関する変異株であることの確認は、第2の温度で培養した菌体について前記のペニシリン結合試験を行うことによって行うことができる。

#### 【0023】

上記のような変異株が得られれば、これを宿主として用いることにより、コリネ型細菌のPBP遺伝子をクローニングすることができる。すなわち、PBPが正常に機能しない変異株を、コリネ型細菌由来の染色体DNAを含むプラスミドで形質転換し、PBPが正常に機能する形質転換株を選択し、プラスミドを回収することにより、PBP遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

#### 【0024】

DNAの切断及び連結、形質転換、形質転換株からの組換えDNAの抽出、及びコロニーハイブリダイゼーション等の一般的な遺伝子組換えに用いられる技術は、当業者によく知られた書籍、例えばモレキュラー・クローニング (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 等に詳述されている。

#### 【0025】

染色体DNAライブラリーは、以下のようにして作製することができる。まず、コリネ型細菌から斎藤、三浦の方法 (H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619, (1963)) 等により染色体DNAを調製する。該染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1~10ユニット/mlで様々な時間(1分~2時間)染色体DNAに作用させてこれを消化する。

#### 【0026】

ついで、切断された染色体DNA断片を、エシェリヒア・コリ細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素 Sau3AI と同一末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えば BamHI を、温度30℃以上、酵素濃度1~100ユニット/mlの条

件下で1時間以上、好ましくは1～3時間、ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と開裂切断されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好ましくはT4DNAリガーゼを、温度4～16℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させて組換えDNAを得る。

【0027】

エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

【0028】

また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつDNA断片（例えば、pAM 330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM 1519（特開昭58-77895号公報参照）、pCG 1（特開昭57-134500号公報参照）、pCG 2（特開昭58-35197号公報参照）、pCG 4（特開昭57-183799号公報参照）、pCG 11（特開昭57-183799号公報参照）等から調製できる）を挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【0029】

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をカッコ内に示した。

- pAJ655 エシェリヒア・コリAJ11882(FERM BP-136)
- コリネバクテリウム・グルタミカムSR8201(ATCC39135)
- pAJ1844 エシェリヒア・コリAJ11883(FERM BP-137)
- コリネバクテリウム・グルタミカムSR8202(ATCC39136)
- pAJ611 エシェリヒア・コリAJ11884(FERM BP-138)
- pAJ3148 コリネバクテリウム・グルタミカムSR8203(ATCC39137)

pAJ440 バチルス・ズブチリスAJ11901 (FERM BP-140)

【0030】

得られた組換えDNAを用いて、例えばエシェリヒア・コリ K-12株を形質転換して染色体DNAライブラリーを作製する。この形質転換は D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology, 68, 326, 1979) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 等により行うことができる。

【0031】

次に、得られた染色体DNAライブラリーを用いて、PBPが正常に機能しないコリネ型細菌変異株を形質転換する。コリネ型細菌の形質転換法としては、上記の細胞を塩化カルシウムで処理する方法、または細胞がDNAを取込可能な特定の成長時期に取り込む方法 (Duncan, C. H. et al.によるバチルス・ズブチリスに関する報告) がある。さらに、プラスミドDNAを容易に取り込むDNA受容体のプロトプラストまたはスフェロプラストを成形することによって細菌細胞内に取り込むことが可能である。これらは、バチルス・ズブチリス、アクチノマイセス及び酵母について知られている (Chang, S. et al. Molec. Gen. Genet., 168, 111, (1979)、Bibb et al., Nature, 274, 398, (1978)、Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))。その他、特開平2-207791号公報にコリネ型細菌の形質転換法が開示されている。

【0032】

形質転換した変異株を、形質転換してない変異株 (宿主) が増殖できない条件で平板培養し、コロニーを形成する株を選択すれば、PBP遺伝子が導入された形質転換株を得ることができる。得られた形質転換株から、例えば P. Guerryらの方法 (J. Bacteriol., 116, 1064, (1973))、D. B. Clewellの方法 (J. Bacteriol., 110, 667, (1972)) などにより組換えDNAを単離することにより、PBP遺伝子を含有するDNA断片を得ることができる。また、公知の微生物のPBP、例えばエシェリヒア・コリのPBPをコードする遺伝子、又はその塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションによっても、PBP遺伝子を含む組換えDNAで形質転換されたコリネ型細菌を取得でき

る可能性もある。

#### 【0033】

PBPが正常に機能しないコリネ型細菌は、変異処理の他に、上記のようにして得られるPBP遺伝子を利用することによっても創製することができる。PBP遺伝子の内部を欠失し、正常に機能するPBPを産生しないように改変したPBP遺伝子（欠失型PBP遺伝子）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型PBP遺伝子と染色体上のPBP遺伝子との間で組換えを起こさせることにより、染色体上のPBP遺伝子を破壊することができる。このような相同組換えによる遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがあるが、本発明においては温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法が好ましい。

#### 【0034】

欠失型PBP遺伝子を、宿主染色体上のPBP遺伝子と置換するには以下のようによればよい。すなわち、温度感受性複製起点と変異型PBP遺伝子とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

#### 【0035】

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するPBP遺伝子配列との組換えを起こし、染色体PBP遺伝子と欠失型PBP遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なPBP遺伝子が優性であるので、形質転換株はPBPを発現し、増殖することができる。

#### 【0036】

次に、染色体DNA上に欠失型PBP遺伝子のみを残すために、2個のPBP遺伝子の組換えにより1コピーのPBP遺伝子を、ベクター部分（温度感受性複

製起点及び薬剤耐性マーカーを含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なPBP遺伝子が染色体DNA上に残され、欠失型PBP遺伝子が切り出される場合と、反対に欠失型PBP遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なPBP遺伝子が切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、欠失型PBP遺伝子が染色体DNA上に残された場合は、正常なPBP遺伝子を含むプラスミドが細胞から脱落するため増殖できないが、正常なPBP遺伝子が染色体DNA上に残された場合は増殖できる。したがって、温度感受性複製起点が機能する温度で増殖することができ、温度感受性複製起点が機能しない温度で増殖できない株を選択することによって、染色体DNA上のPBP遺伝子が破壊され、正常なPBP遺伝子をプラスミド上に保持する株を得ることができる。

## 【0037】

上記のようにして得られるPBP遺伝子破壊株は、温度感受性複製起点が機能する温度(例えば低温)で培養すればPBP遺伝子を細胞内に保持し、温度感受性複製起点が機能しない温度(例えば高温)で培養すればPBP遺伝子を欠損する。以下の記載において、温度感受性プラスミドが複製不能な温度を高温として説明するが、これは低温である可能性を排除する意図ではなく、低温では複製不能であり、高温では複製可能な温度感受性複製起点が得られれば、これを用いてもよい。

## 【0038】

尚、本発明に用いる微生物として、 $recA^-$ 株を用いると、低温で培養中にプラスミド上のPBP遺伝子が染色体へ組み込まれるのを防ぎ、遺伝子の脱落を確実にすることができる点で好ましい。

## 【0039】

温度感受性複製起点は、コリネ型細菌細胞内で自律増殖可能であり薬剤耐性を有するプラスミドを変異処理し、そのプラスミドでコリネ型細菌を形質転換し、薬剤を含む培地で低温では生育でき、高温では生育できない形質転換株からプラスミドを回収することによって得られる。



## 【0040】

プラスミドの変異処理は、例えばプラスミドをインビトロでヒドロキシルアミン処理する方法 (G. O. Humpherys, et al., Molec. gen. Genet., 145, 101-108 (1976) などがある) が挙げられる。

## 【0041】

ここでいう「低温」とは、「高温」に対する相対的な概念であり、低温と高温との境界は特に制限されるものではないが、少なくとも「低温」とはコリネ型細菌を培養したときに増殖できる温度範囲であり、また、「高温」とはコリネ型細菌自体が死滅しない温度範囲である。これら低温と高温との境界は、温度感受性プラスミドを保持する形質転換体を、薬剤を含む培地で温度を変えて培養し、生育できない温度の下限を調べることによって、決定することができる。

## 【0042】

コリネ型細菌細胞内で機能する温度感受性複製起点を有するプラスミドとしては、pHS4、pHS22、pHS23が挙げられる。また、pHS4から切り出したコリネ型細菌由来の複製起点を含むDNA断片を、エシェリヒア・コリ用のベクターであるpHSG398に接続して得られたプラスミドpHSC4も、同様に温度感受性プラスミドとして本発明に使用することができる。pHSC4は、コリネ型細菌、及びエシェリヒア・コリ中で自律増殖して、宿主にクロラムフェニコール耐性を付与する。pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。

## 【0043】

これらの温度感受性プラスミドはコリネ型細菌細胞中において、約10～32℃では自律増殖できるが、約34℃以上では自律増殖できない。

温度感受性複製起点を有するDNA断片は、例えば上記pHSC4をBamHIとKpnIで切り出すことによって得られる。

## 【0044】

尚、上記の各々のプラスミドの構築及びその温度感受性複製起点を含む領域の塩基配列は、特公平7-108228号公報に記載されている。

【0045】

<3> L-グルタミン酸の生産

上記のようなPBPが正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することにより、L-グルタミン酸の製造することができる。本発明の方法によれば、モラセスのような十分量のビオチンを含む培地で、ビオチン作用抑制物質を添加することなくL-グルタミン酸を製造することができる。

【0046】

用いるコリネ型細菌が、第1の温度ではPBPが正常に機能し、第2の温度ではPBPが正常に機能しない細菌である場合には、該細菌を、第1の温度で培養して増殖させた後、第2の温度にシフトして培養し、L-グルタミン酸を産生させる。

【0047】

温度シフトの態様として、具体的には、種培養を低温で行い、主発酵培地での培養（本培養）を高温で行う方法が挙げられる。また、前培養の途中、又は本培養の途中で温度シフトを行ってもよい。尚、菌体の増殖工程とプラスミドの脱落工程は、明確に区分されるものではなく、プラスミドの脱落工程は菌体の増殖を伴う。

【0048】

温度シフトのタイミングは、温度シフトまでの培養時間を変えて予備実験を行うことにより、低温での培養時間を容易に決定することができる。一般的には、対数増殖期において所望の細胞密度に達するまで培養した後、プラスミドが複製不能な温度にシフトすればよい。

【0049】

培養に用いる培地は特に制限されず、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いることができる。特に

、本発明においては十分量のビオチンを含む培地を用いることができる。

【0050】

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースや澱粉加水分解物などの糖類、エタノールやイノシトールなどのアルコール類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0051】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0052】

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB<sub>1</sub>などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させることが望ましい。

【0053】

培養は好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は20℃～45℃に、培養中pHは5～8.5に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0054】

発酵液からのL-グルタミン酸の採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0055】

【実施例】

以下、本発明の実施例を説明する。

【0056】

【実施例1】コリネ型細菌のPBPの検出

コリネ型細菌のPBPの検出は、上記Spratt等の方法を基本とし、具体的には以下の方法で行った。

【0057】

### <1>膜画分の調製

PBPは膜蛋白質であると考えられている。コリネ型細菌の膜画分の調製は以下の通りに行った。コリネ型細菌野生株ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869株を20 mlのA培地(ポリペプトン10 g、酵母エキス5 g、NaCl 5 g、グルコース5 gを水1 L中に含む)に植菌し、30℃にて振とう培養し、660 nmの吸光度が約1.0になったところで集菌し、50 mM、pH 7.0のリン酸ナトリウムバッファーにて洗浄した。その後、同バッファー中にガラスビーズを添加し、超音波処理を行い菌体を破碎した。遠心により破碎残渣を除去した後、100,000×gで30分超遠心し、膜画分を回収した。得られた画分を同バッファーを用いて洗浄し、最終的に500 μlの同バッファーに懸濁したものを膜画分とした。この膜画分の蛋白質濃度を蛋白質定量キット(PIERCE社製、Micro BCA Protein assay kit)を用いて定量したところ、4 mg/mlであった。

【0058】

### <2>ペニシリン結合反応

調製した膜画分30 μlに3 μlの<sup>14</sup>C-ペニシリンG (Amersham社製)を添加し、30℃、10分反応させた後、2 μlの15%ザルコシル(N-ラウロイルザルコシンナトリウム)および45 mg/mlのペニシリンGを加え、室温にて20分間放置した。13,000rpm、30分、20℃遠心により可溶性画分を取得した。このサンプルを10%のポリアクリルアミドを含むゲルを用いてSDS-PAGEを行い、ゲルを固定、乾燥した後、富士フイルム社製イメージアナライザーBAS2000にて解析した。その結果、110 kDa、100 kDa、および60 kDaの3つのバンドが検出され、それぞれをPBP1、PBP2、およびPBP3と命名した。

【0059】

### <3>PBP結合阻害剤を用いた解析

ペニシリンGの誘導体であるメシリナムとPBPとの親和性を調べた。方法は、上記のペニシリン結合反応前にメシリナムを濃度を変化させて添加し、同位体(<sup>14</sup>C)標識したペニシリンGとの結合の阻害度を調べることにより誘導体とP

B Pとの親和性を調べた。その結果、メシリナム添加によりP B P 3のみが標識ペニシリンGとの結合が阻害された。すなわち、メシリナムはP B P 3と選択的に結合することが明らかとなった(図1)。

【0060】

【実施例2】メシリナム添加によるコリネ型細菌のグルタミシ酸生産

上記A培地にブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869株を植菌し、30℃、2時間振とう培養後、0.01  $\mu$ M~100  $\mu$ Mのメシリナムを添加し、さらに8時間振とう培養を行った。その後、培地中のグルタミン酸濃度をバイオテックアナライザーAS210(旭化成社製)を用いて測定した(表1)。

【0061】

【表1】

添加メシリナム濃度( $\mu$ M)	L-グルタミン酸濃度(mg/L)
0	0
0.1	0
1.0	0
10	0
100	575

【0062】

メシリナム添加によりL-グルタミン酸を生成している条件下で、メシリナムと結合するのはP B P 3のみであることから、ペニシリンまたはメシリナムによるグルタミン酸の生成は、少なくともP B P 3機能を阻害することにより引き起こされることが示された。

【0063】

【発明の効果】

本発明により、十分量のビオチン存在下で、ビオチン作用抑制物質を添加せず

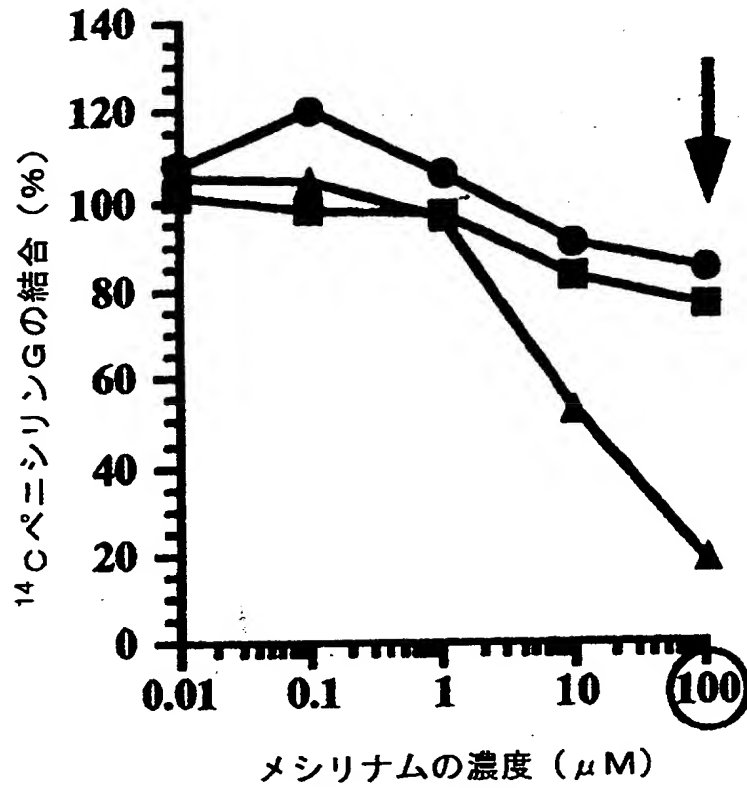
にL-グルタミン酸を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 PBP3とペニシリンGとの結合に対するメシリナムの阻害を示すグラフ図。矢印は、最小阻止濃度を示す。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ペニシリン結合蛋白が正常に機能しておらず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することにより、L-グルタミン酸を製造する。

【発明の効果】 コリネ型細菌を用い、十分量のビオチン存在下で、ビオチン作用抑制物質を添加せずにL-グルタミン酸を製造することができる。

【選択図】 図1



【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000000066

【住所又は居所】

東京都中央区京橋1丁目15番1号

【氏名又は名称】

味の素株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100089244

【住所又は居所】

東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ

ビル6階 秀英国際特許事務所

【氏名又は名称】

遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】

100090516

【住所又は居所】

東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ

ビル6階 秀英国際特許事務所

【氏名又は名称】

松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】

100100549

【住所又は居所】

東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ

ビル6階 秀英国際特許事務所

【氏名又は名称】

川口 嘉之

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日	1991年 7月 2日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名	味の素株式会社